

令和元年6月16日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03181

研究課題名(和文)免疫細胞捕集デバイスの開発

研究課題名(英文)Development of a device for capturing immune cells

研究代表者

木村 剛 (KIMURA, Tsuyoshi)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：10393216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：がんや免疫関連疾患への応用をめざして、免疫細胞を選択的に捕獲し、回収する免疫細胞捕集デバイスの開発を実施した。捕集デバイスに搭載する捕集フィルターの表面改質ならびに標的細胞特異的抗体を修飾することで、標的細胞を選択的かつ効率的に捕獲することが可能であった。また、捕獲した細胞は細胞機能を保持し、フィルターからの捕獲細胞の回収も可能であり、免疫細胞を選択的に捕集するデバイスの開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した免疫細胞捕集デバイスは、循環中の標的とする免疫細胞を選択的に捕獲することができ、捕獲した細胞の機能を維持させつつ回収することが可能であり、免疫調節における材料学的な点から新しい方法論と考えられる。また、本研究は免疫細胞のみならず多くの細胞種に対しても応用可能であり発展性のある研究と位置づけられる。さらに、体内での免疫調節法としての新たな知見も見出され、材料学の発展に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) are important role for cancer immunotherapy and autoimmune disease because Tregs show immune suppressive functions. For cancer immunotherapy, Tregs prevent effector T cells attacking to cancer cells. For autoimmune disease, when Tregs doesn't work well, effector T cells attack themselves. So, in the preset study, we developed a device that capture Tregs and effector T cell specifically in order to regulate the balance of them in body. We designed the device loading a filter that was modified with non-cell adhesive polymer grafting and antibodies against Treg and effector T cells in order to capture them selectively. The filter could capture target cells effectively and selectively. The captured cells maintained the cell functions. Also, the target cells were captured under flow condition. These results suggest that the device capturing target cells was developed.

研究分野：材料科学

キーワード：生体材料 バイオ界面 免疫学

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がん免疫療法や自己免疫疾患において、免疫抑制的に働く制御性 T 細胞 (Treg) が重要な役割を果たすことが明らかとなってきている。がん免疫治療は、がん細胞が有するがん抗原に対する免疫応答を増強することによりがんを駆逐する治療法であるが、多くの免疫治療法でがん抗原特異的な免疫応答が誘導されるにも関わらず十分な効果が認められていない。その原因は、多くのがん抗原が自己抗原由来であるため、がんに対する免疫応答が免疫寛容すなわち免疫抑制状態となっているためである。この免疫抑制の機序として、腫瘍組織内に浸潤し自己抗原を認識して免疫反応を負に制御する Treg が抗腫瘍免疫応答を抑制していると考えられる。一方、自己免疫疾患については、通常の生体では、Treg により自己反応性の T 細胞は不活化され、自己の抗原に対する免疫抑制状態となっているため自己は攻撃されないが、Treg の機能低下等によりバランスが乱れると活性化された T 細胞 (エフェクター T 細胞: T<sub>eff</sub>) により自己が攻撃され自己免疫疾患を発症する。これらの治療法として、がん免疫療法に対しては Treg を、自己免疫疾患に対しては T<sub>eff</sub> を体内から物理的に除去することが効果的と言える。これまで、坂口らは動物モデルにて、抹消血中の Treg を担癌生体から除去すると抗腫瘍免疫応答が増強し、がんを拒絶できることを明らかにしている (Nishikawa et al. Blood 2005)。しかしながら、ヒトでは生体内から有効に Treg を除去する方法はない。一方、自己免疫疾患に対する T<sub>eff</sub> の除去に関する報告はないが、Treg 除去によるさまざまな自己免疫疾患の誘導および Treg の補充による発症抑制が報告されている (Sakaguchi et al. J Immunol 1995)。申請者のグループでは、標的細胞を特異的に捕集するデバイスの開発を進めている。体外循環にて標的細胞をフィルター内にトラップする方法である。本デバイスは細胞を捕獲するのみでなく捕獲した細胞を回収できる設計であり、回収した細胞の生体内への注入等の応用を想定している。これまで、捕集デバイスの作用原理について、標的細胞の選択的な捕獲および回収に成功している。

## 2. 研究の目的

本研究では、免疫抑制性・反応性細胞にそれぞれ適した捕集デバイスを開発し、疾患モデル動物を用いた体外循環での免疫抑制性・反応性細胞の捕集を行い、標的細胞の除去効果ならびに捕集細胞の注入効果を検討し、捕集デバイスの有効性を示すことを目的としている。開発する捕集デバイスは、捕集フィルターにて標的細胞を選択的に捕獲するためにフィルター繊維を細胞非接着性ポリマーのグラフトにて改質し、標的細胞に対して特異的な認識分子を固定化する。認識分子の固定化の際には解離性分子を導入することで、解離処理にて捕獲した細胞をフィルターから解離させて回収する (図 1)。本研究では、捕集フィルター表面を構成するグラフト鎖、認識分子、解離性分子の 3 要素について、それぞれの種類、密度、固定化法やそれらの組み合わせを変えて合成し、各パラメータが標的細胞の捕獲・回収にどのように影響を及ぼすかを明らかにする。細胞の捕獲・回収における各要素の寄与に関する知見を基に高捕獲率、高回収率な細胞捕集フィルターを合成する。また、回収した細胞を応用するためには、回収細胞の生存性および機能性の維持が重要であることから、細胞の生存および機能性維持が可能な細胞捕集フィルターの合成条件を見出す。さらに、疾患モデル動物を作出し、開発した細胞捕集デバイスを用いた細胞除去の有効性および回収した細胞の注入による有効性を示す。

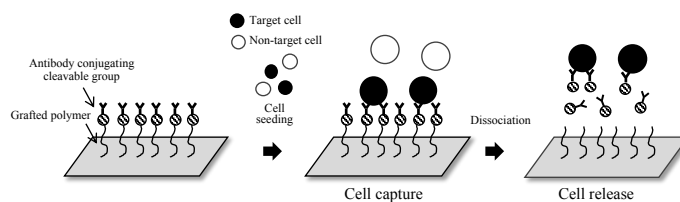


Fig. 1. Selective capture and release of target cells on a desthiobiotin-antibody immobilized surface.

## 3. 研究の方法

標的の免疫細胞を選択的に捕獲・回収する細胞捕集デバイスの開発を目的とし、(1) 細胞捕集フィルターの合成、(2) 細胞の捕獲・回収、(3) 担がんモデル動物での評価法の確立を研究課題の大項目として研究を実施した。(1) について、捕集フィルターの繊維を細胞非接着性ポリマーでグラフトすることで改質し、標的の免疫細胞に対して特異的な認識分子を固定化するように設計し、合成した。認識分子の固定化の際には解離性分子を導入することで、解離処理にて捕獲した細胞をフィルターから解離させて回収するデザインである。(2) について、Treg、effector T 細胞を脾臓より採集し、細胞捕集フィルターの細胞の捕獲、回収を検討した。捕獲細胞の生存性、選択性、機能維持性を評価した。さらに、細胞流路系を構築し、流路系での細胞捕獲を検討した。(3) について、種々のがん細胞を用いたモデル動物の作成を行った。

## 4. 研究成果

細胞捕集フィルターの設計・合成について、フィルター表面に細胞非接着性ポリマーであるポリアクリル酸 (PAAc) をグラフト重合し、その側鎖に解離性分子で修飾した抗体を導入し

て、細胞捕集フィルターを得た(図2)。PAAc グラフト基材の作製では、重量の増加、接触角の低下、メチレンブルーでの陽性染色が示され、PAAc グラフト鎖の導入が確認できた。PAAc グラフト量は、AAc 仕込み量の増加に伴い増加した(グラフト密度: 1.5~45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )。モデル細胞を用いて細胞選択的な捕獲を検討した。細胞非接着性のポリマーグラフト鎖の導入による非特異的細胞接着を抑制することができ、また、表面に標的細胞の特異的抗体を固定化することで選択的な細胞捕獲が可能であった(図3)。抗体固定化量の増加に伴う細胞捕獲率の上昇が示された。

次に、細胞捕集フィルター表面への抗体固定化の際に解離性分子を導入することで捕獲した細胞を回収できたかを脾臓細胞を用いて検討した。脾臓細胞のうち30~50%がCD25陽性細胞である。細胞捕獲率は、細胞非接着フィルターで約1.4%、CD25抗体固定化フィルターで約23%であり、脾臓細胞に含まれる標的細胞Tregを高効率に捕獲することが可能であった。捕獲細胞の解離・回収を行った後は約0.6%に低下しており、高効率に捕獲細胞を回収することが可能であった(図4)。回収効率は抗体固定化量に依存し、高効率の回収のためには条件の最適化が必要とわかった。フィルター種類(繊維系、繊維間距離など)を最適化し、抗体固定化量を調節したことより細胞捕獲率の最適化できたと考えられる。また、高効率な捕獲細胞の回収のためには、解離反応の調節が必要であった。捕獲細胞の細胞機能発現は、捕獲前後で有意な差異は認められず、開発した細胞捕獲フィルターの基本的な設計原理が実証できた。担がんモデルマウスの作出と、血液中のTreg変化などの一部の動物実験評価系を確立した。

以上より、本研究課題では、免疫細胞を選択的にかつ高効率に捕獲し、それを回収する免疫細胞捕集デバイスが得られたと言える。本研究は、国内外の学会で高い評価を受けており、日本バイオマテリアル学会にて2016 Journal of Materials Chemistry B Presentation Prize at The Symposium 2016 of The Japanese Society for Biomaterialsを受賞した。また、本研究の実験動物を用いた安全性評価を実施中、細胞捕獲フィルターに固定化された抗体を介した細胞捕獲とそれによる免疫系のシフトが示された。これは、当初予期していない新たな発見と言えます、免疫調節マテリアルとしての発展の可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6件)

1. 木村剛\*、中村奈緒子、橋本良秀、坂口志文、木村俊作、岸田晶夫、解離型分子を介した抗体固定化グラフト表面を用いた選択的な細胞捕獲・回収による細胞分離、高分子論文集(Kobunshi Ronbunshu)、75(2)、155-163、2018  
DOI: org/10.1295/koron.2017-0074
2. Tsuyoshi Kimura\*、Naoko Nakamura、Kanji Umeda, Yoshihide Hashimoto and Akio Kishida, Capture and release of cells using a temperature-responsive surface that immobilizes an antibody through DNA duplex formation, Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition, 28(10-12), 1172-1182, 2017.  
DOI: 10.1080/09205063.2017.1309124
3. Tsuyoshi Kimura\*、Naoko Nakamura、Nao Sasaki, Yoshihide Hashimoto, Shimon Sakaguchi, Shunsaku Kimura, and Akio Kishida, Capture and Release of Target Cells Using a Surface That Immobilizes an Antibody via Desthiobiotin-Avidin Interaction, Sensor and Materials, 28(12), 1255-1263, 2016.  
DOI: 10.18494/SAM.2016.1287

[学会発表] (計 20件)

1. 木村剛、中村奈緒子、橋本良秀、坂口志文、木村俊作、岸田晶夫. 抗体固定化フィルターによる免疫細胞捕集. 第67回高分子討論会 2018.09.12 北海道
2. T. Kimura, N. Nakamura, S. Sakaguchi, S. Kimura, A. Kishida. Development of an antibody immobilizing device for label-free selective capture of target cells. Finland-Japan Workshop: The next generation medical engineering in biomaterials

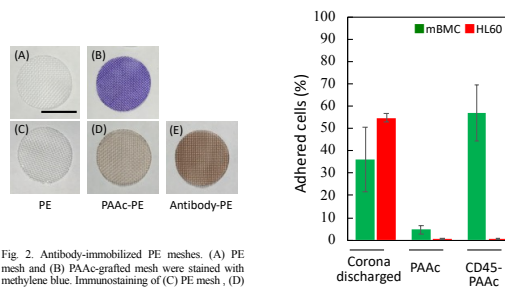


Fig. 2. Antibody-immobilized PE meshes. (A) PE mesh and (B) PAAc-grafted mesh were stained with methylene blue. Immunostaining of (C) PE mesh, (D) PAAc-grafted PE mesh and (E) mCD25-immobilized PE mesh. Scale: 10mm.

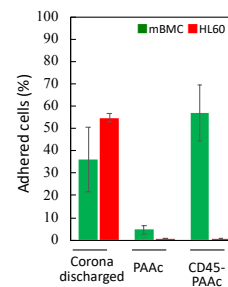


Fig.3. Selective capture of target cells on the antibody immobilized PE film.

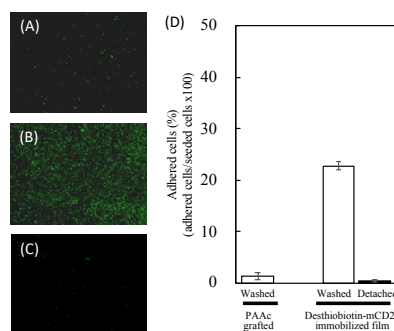


Fig. 4. Capture and release of spleen cells using mCD25-immobilized film. Fluorescent images of adhered spleen cells on (A) PAAc-grafted film, (B) mCD25-immobilized film, (C) mCD25-immobilized film after dissociation reaction. (D) Number of adhered spleen cells on PAAc-grafted film and mCD25-immobilized film before and after dissociation reaction.

2018.06.17 Oulu, Finland

3. T. Kimura, N. Nakamura, Y. Hashimoto, A. Kishida. Induction of immunogenic cell death of cancer cell by using chemical detergent treatment and its activation of immune system. Experimental Biology 2018 2018.04.21 San Diego, USA
4. 木村剛, 橋本良秀, 中村奈緒子, 岸田晶夫. 生体内免疫調節を目指した細胞捕集技術開発. 第27回ライフサポート学会フロンティア講演会 2018.03.09 東京
5. T. Kimura, N. Nakamura, Y. Hashimoto, A. Kishida. Development of an antibody immobilizing device for label-free selective capture and collection of stem cells. TERMIS-AM 2017 2017.12.03 Charlotte, USA.
6. T. Kimura, T. Kubota, N. Nakamura, Y. Hashimoto, A. Kishida. Preparation of ICD induced cancer cells and activation of immune system. iLIM-2 2017.09.29 Nagoya, Japan.
7. T. Kimura, N. Nakamura, Y. Hashimoto, S. Sakaguchi, S. Kimura, A. Kishida. Selective capture of regulatory T cells for cancer immunotherapy. SFB2017 Annual Meeting and Exposition 2017.04.05 Minneapolis, USA.
8. 木村剛, 中村奈緒子, 橋本良秀, 坂口志文, 木村俊作, 岸田晶夫. 抗体固定化フィルターによる免疫細胞の捕集. 第39回日本バイオマテリアル学会大会 2017.11.20 東京.
9. 木村剛, 中村奈緒子, 橋本良秀, 坂口志文, 木村俊作, 岸田晶夫. 抗体固定化フィルターを用いた免疫細胞捕集. 第66回高分子討論会 2017.09.20 愛媛.
10. 木村剛, 中村奈緒子, 橋本良秀, 坂口志文, 木村俊作, 岸田晶夫. 免疫系セルセパレーターの開発を目指した界面設計. 第46回医用高分子シンポジウム 2017.07.25 東京.
11. 木村剛, 窪田幸明, 中村奈緒子, 橋本良秀, 岸田晶夫. がんワクチンへの応用を目指した免疫原性細胞死誘導細胞の調製. 第66回高分子学会年次大会 2017.05.29 千葉.
12. T. Kimura, N. Nakamura, Y. Hashimoto, S. Sakaguchi, S. Kimura, A. Kishida. Label-free capture and collection of lymphocytes using a surface immobilizing antibody. 第66回高分子学会年次大会 2017.05.29 千葉.
13. 窪田幸明, 中村奈緒子, 橋本良秀, 木村剛, 岸田晶夫. がんワクチン治療への応用を目指した免疫原性細胞死 (ICD) の新規誘導に関する研究. 第26回ライフサポート学会フロンティア講演会 2017.03.10 東京.
14. 窪田幸明, 中村奈緒子, 橋本良秀, 木村剛, 岸田晶夫. がんワクチン治療への応用を目指した免疫原性細胞死 (ICD) の新規誘導法. 第14回日本免疫治療学研究会学術集会 2017.02.11 東京.
15. 木村剛, 中村奈緒子, 巻口遥翔, 橋本良秀, 坂口志文, 木村俊作, 岸田晶夫. 制御性T細胞の選択的捕獲・回収と機能評価. 第26回インテリジェント材料・システムシンポジウム 2017.01.11 東京.
16. T. Kimura, N. Nakamura, Y. Hashimoto, S. Sakaguchi, S. Kimura, A. Kishida. Label-free capture and collection of target cells using a surface immobilizing antibody. 2016 TERMIS-Americas Conference & Exhibition 2016.12.11 San Diego, USA.
17. T. Kimura, N. Nakamura, Y. Hashimoto, S. Sakaguchi, S. Kimura, A. Kishida. Capture and release of lymphocyte on an antibody-immobilized surface. ICBS2016 2016.11.28 Tokyo, Japan.
18. 木村剛, 中村奈緒子, 坂口志文, 木村俊作, 岸田晶夫. 抗体固定化基材を用いた細胞の捕獲と回収. 第26回日本MRS年次大会 2016.12.19 神奈川.
19. 木村剛, 中村奈緒子, 橋本良秀, 坂口志文, 木村俊作, 岸田晶夫. 免疫細胞分離のバイオインターフェイス開発. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 2016.11.21 福岡.
20. 木村剛, 中村奈緒子, 佐々木直, 坂口志文, 木村俊作, 岸田晶夫. 抗体修飾基材を用いた細胞の特異的捕獲と回収. 第65回高分子学会年次大会 2016.05.25 兵庫.

[図書] (計 3件)

1. 木村剛、岸田晶夫、医歯薬出版、「第3章2高分子材料」再生歯科学、2019
2. 木村剛、シーエムシー出版、「第II編 第4章 脱細胞化組織の応用」脱細胞化組織の作製法と医療・バイオ応用、2019
3. 鈴木郁郎、木村剛、シーエムシー出版、「第III編 第9章 脱細胞化脳」脱細胞化組織の作製法と医療・バイオ応用、2019

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0件)
- 取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.labonet.info/kishida/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：中村奈緒子

ローマ字氏名：(NAKAMURA, Naoko)

所属研究機関名：芝浦工業大学

部局名：システム理工学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：70754878

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：橋本良秀

ローマ字氏名：(HASHIMOTO, Yoshihide)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。